

別紙 1

論文審査の要旨

報告番号	甲 第 2795 号	氏 名	平沼 克洋
論文審査担当者	主査 教授 美島 健二 副査 教授 桑田 啓貴 副査 准教授 宮本 洋一		
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文「Expression of nephronectin is enhanced by $1\alpha, 25$-dihydroxyvitamin D_3」について、上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p>これまで筆者らは、活性型ビタミンD_3に Integrin $\alpha_8\beta_1$ に結合する細胞外基質である Nephronectin の発現を強く促進させる作用を見出してきた。本研究では活性型ビタミンD_3 の骨芽細胞における Nephronectin の発現誘導能について検証した。すなわ、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用い、活性型ビタミンD_3 と、その構造類縁体である EB1089 および Calcipotriol を処理し 24 時間培養した。その結果、活性型ビタミンD_3 およびその構造類縁体を処理した細胞で Nephronectin の発現の上昇が認められた。次に、活性型ビタミンD_3 による Nephronectin の発現制御がビタミン D 受容体を介して行われている可能性を検討するために、ビタミン D 受容体に対する siRNA 導入後に活性型ビタミンD_3 により誘導される Nephronectin の発現量を検討した。結果として、siRNA 処理によりビタミン D 受容体の発現が低下した細胞において活性型ビタミンD_3 による Nephronectin の発現誘導は抑制され、骨芽細胞株において活性型ビタミンD_3 はビタミン D 受容体を介し Nephronectin の発現を濃度及び時間依存的に制御していることが示唆された。</p> <p>本論文の審査において、副査の桑田委員および宮本委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p>桑田委員の質問とそれらに対する回答：</p> <ol style="list-style-type: none"> 細胞表面に発現しているインテグリン $\alpha_8\beta_1$ の組み合わせの生物学的意義を説明しなさい。 (RGD 配列を有するインテグリンには、殆どの細胞外マトリックスタンパク質が結合することが知られている。α と β の 2 種類の組み合わせからなり、$\alpha_8\beta_1$ は主に間葉細胞に局在し、上皮-間葉細胞間の相互作用が報告されている。) 今回実験に用いた MC3T3-E1 細胞とはどのような細胞ですか、説明しなさい。 (マウス頭蓋冠由来の細胞株として、骨芽細胞の分化誘導を検討する実験に多用されています。) ActinomycinD を添加した際の細胞への影響について、どのような機序で転写を阻害するのか。 (転写阻害剤である ActinomycinD は、DNA の 2 本鎖に結合することで、複製や転写に関与する酵素 			

(主査が記載)

素の働きを妨げる。DNA のグアニン塩基と結合することで、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼを阻害し、転写が抑制される。長時間処理により細胞に毒性を与えるが、今回は細胞毒性に影響のない条件で行った。）

4. これまでに報告されている Npnt の骨芽細胞における役割を説明せよ。

（Npnt を過剰発現させた骨芽細胞では分化が促進される事が報告されており、またその作用はサイトカイン刺激によって分化を阻害された細胞でも回復がみられることから、骨芽細胞の分化誘導に促進的な作用がある事が示唆されている。）

宮本委員の質問とそれらに対する回答：

1. 骨芽細胞における Npnt の発現制御に着目した理由を説明せよ。

（Npnt は骨芽細胞における分化を誘導する作用が知られており、またビタミン D 受容体が発現している事も知られているので、今回活性型ビタミン D₃ による Npnt の発現制御機構を検討するにあたって適切な細胞であると判断したため。）

2. Npnt の骨組織あるいは骨芽細胞における役割についてはどのような報告があるか、説明せよ。

（Npnt を過剰発現させた骨芽細胞では分化が促進される事が報告されており、またその作用はサイトカイン刺激によって分化を阻害された細胞でも回復がみられることから、骨芽細胞の分化誘導に促進的な作用がある事が示唆されている。）

3. 腎臓の一部の細胞も VDR を持ちますが、骨芽細胞と同様の発現制御が予想されるか、説明せよ。

（生体における腎臓に対しての活性型ビタミン D の作用に関して、カルシウムの再吸収がよく知られているが、腎臓の発生には直接的な関連性は無いことから、細胞外マトリックスタンパク質である Npnt の発現には関連性は少ないと予想される。）

美島委員の質問とそれらに対する回答：

1. Nephronectin を発現している細胞はどのようなものがあるか？

（骨芽細胞に多く発現している。また、硬組織以外では腎臓の尿管上皮細胞で発現し、後腎間葉細胞のインテグリン $\alpha_8\beta_1$ 部位に接着する事が知られている。）

2. Nephronectin による骨芽細胞分化誘導のメカニズムについて述べよ。

（Nephronectin が RGD 配列を介して細胞表面のインテグリン $\alpha_8\beta_1$ 部位に結合した後、細胞内で MAPK 経路の活性化を介して骨芽細胞の分化を促進する事が知られている。）

3. Nephronectin のプロモーター領域には VDR の Binding region が存在しているか。

（Npnt 遺伝子の転写開始点から上流 3kbp の位置に VDRE の存在が予想されていたが、レポーターアッセイにて確認したところ、3kbp 以内の位置には確認できなかった。その為、3kbp より上流に存在すると思われる。）

主査の美島委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。

（主査が記載）